

変異原性試験キット

umu-test ウムラック AT-F

[はじめに]

変異原性試験用キットウムラック AT-Fは医薬品・化学物質・食品・工場廃水・焼却灰などの生活・労働環境にある物質の変異原性の有無を簡便にかつ多数の物質を同時迅速に測定するスクリーニングを目的として開発されました。

癌原性物質の多くは DNA に作用し突然変異を起こすことでがん化させることが知られており、このことから細胞のがん化は遺伝子の機能変化・発現調節の異常等の遺伝子レベルの反応が関与していると考えられます。

本製品は微生物を利用した短期変異原性試験 umu-test を簡便に測定できる様キット化したものです。この試験は DNA への損傷により誘発される一連の遺伝子群(SOS 遺伝子)のうち、突然変異に直接関与している umu 遺伝子の発現を β -galactosidase 活性を指標として定性的に測定する方法です。

さらにこの試験は、現在変異原性試験の主流となっている Ames 試験や実験動物を使って調べる癌原性試験の結果とよく相関しており、Ames 試験では測定が不可能なヒスチジン含有する物質においても試験が可能で、食品・尿・血液・粗抽出物などの検体にも適用できます。

また日本においては 1993 年に上水試験法、1997 年には下水試験方法に公定法として採用されており、ドイツにおいても排水中の安全性を評価する方法に正式採用(DIN-38415-3)されました。さらに 2000 年には国際規格(ISO13829)にも制定されています。

新たに開発したウムラック AT-Fはこれまでのウムラック AT では凍結乾燥されていた umu 試験菌株 NM2009 株を必要量の菌数を冷凍のままキットに添付したことにより、従来キットの感度を維持したまま約 5 時間の試験時間で同時に多数の試料を試験することを可能にしました。

[キットの構成]

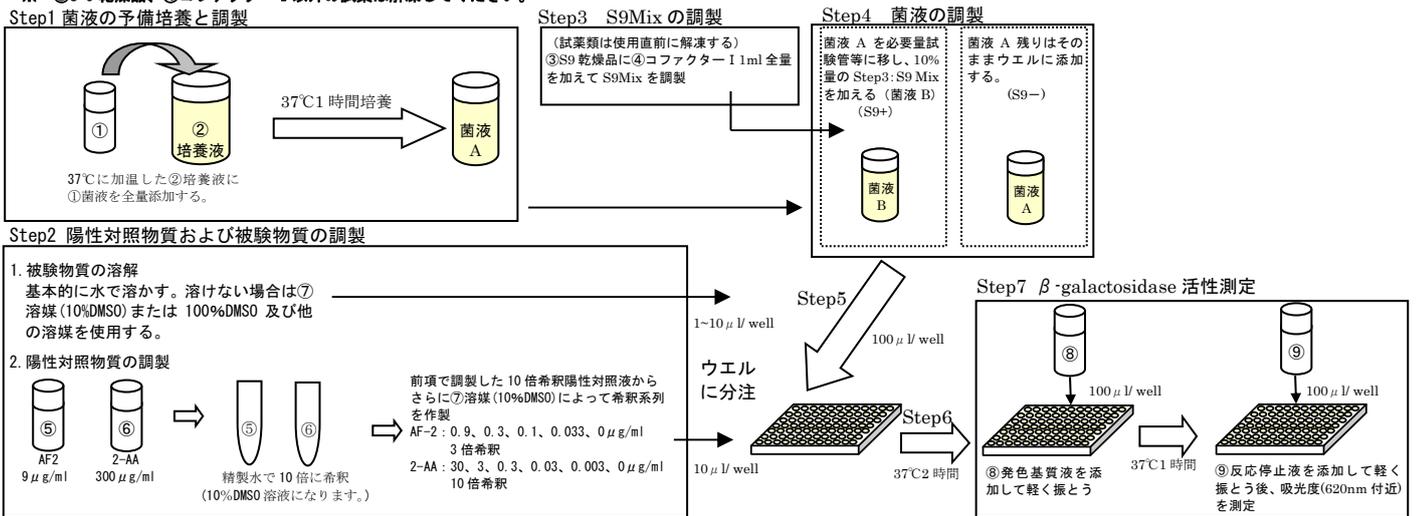
- umu-test 菌株 (NM2009) 凍結品 1 vial
- 培養液 11ml/vial
- ラット肝臓 S9 ホモジネート (乾燥品) 1vial
- コファクター I 液 1ml/vial
- 陽性対照物質(AF-2 9 μ g/ml DMSO 溶解品) 0.5ml/vial
- 陽性対照物質(2-AA 300 μ g/ml DMSO 溶解品) 0.5ml/vial
- 希釈用溶媒(10%DMSO) 13ml/vial
- 発色基質液(X-gal 溶液) 11ml/vial
- 反応停止液 11ml/vial
- 96well マイクロプレート 1 枚

[使用器具類]

マイクロピペット、マルチピペット、試験管 (破損防止のため PP 製をお薦めします)、精製水、適当な溶媒、インキュベーター (37°C)、プレート振とう機、マイクロプレート用イムノリーダー (測定波長 610nm~670nm)

[測定フロー] 下記フローチャートで各操作の時間的前後関係を参照してください。

* ③S-9 乾燥品、④コファクター I 以外の試薬は解凍してください。



[測定方法]

前準備：培養液の予備加温
 37°C に設定した水浴槽もしくはインキュベーターで十分に加温してください。

Step1：菌の予備培養
 冷凍状態の菌体を室温で融解し、0.5ml 全量を加温した培養液中に添加して軽く混和し、37°Cインキュベーターで 1 時間予備培養を行ってください。

Step2：陽性対照物質および被験物質の調整
 1. 被験物質の溶解・希釈
 被験物質は可溶化できる適当な溶媒を選択し、希釈系列を作り適当な濃度に調整してください。未知の被験物質については希釈系列を広くとることをお薦めいたします。

※詳細については後に記載してある[検体の採取]、[検体希釈の溶媒とサンプル量]、[未知検体の用量設定]を参照してください。

2. 陽性対照物質の希釈
 ⑤AF-2(9 μ g/ml)、⑥2-AA(300 μ g/ml)は 100%DMSO に溶解してあります。これらを精製水で 10 倍希釈(例: 100 μ l/900 μ l)することにより、10%DMSO に溶解された状態になりますので、以降は⑦溶媒(10%DMSO)で⑤AF-2 は 3 倍段階希釈(例:100 μ l/200 μ l)、⑥2-AA は 10 倍段階希釈(例:100 μ l/900 μ l)を行ってください。

AF-2=0.9, 0.3, 0.1, 0.033, 0 μ g/ml
 2-AA=30, 3, 0.3, 0.03, 0.003, 0 μ g/ml

キットの性能を確認するための操作ですので、下線の濃度サンプルのみ添加するだけで構いません。

3. 分注
 Step1 の菌の予備培養間に 2. で希釈した陽性対照物質 10 μ l を well 毎に添加してください。また調整した被験物質は 1~10 μ l の範囲内で添加をしてください。

※溶媒によっては溶媒濃度が高いとマイクロプレートを溶かし、測定に影響を及ぼす可能性があります。その際は少量を添加していただくか、もしくは菌液を添加後の well に添加してください。

Step3：S9Mix の調製
 ③ラット肝臓 S9 ホモジネート(乾燥品)に室温で解凍した④コファクター I 液を全量添加し、静かに攪拌してください。
 ※使用直前に調製を行ってください。

Step4：菌液の調製
 1. S9(-)菌液
 Step1 で予備培養を行った菌液をそのままお使いください。

2. S9(+)菌液
 代謝活性化が必要な陽性対照物質(2-AA)や被験物質には S9Mix を添加した菌液をご使用ください。必要な菌液量に対して 10%の S9Mix を混和してください。(例：5ml 菌液に対して S9Mix 0.5ml)

Step5. 菌液の分注
 Step4 で調製した菌液をあらかじめ陽性対照物質と被験物質を添加しておいたマイクロプレートに 100 μ l/well 分注してください。

Step6：インキュベーション
 被験物質および菌液を添加したマイクロプレートを軽く振盪し、37°C インキュベーター内で 2 時間反応 (静置) させてください。

Step7: β -galactosidase 活性測定

1. あらかじめ加温しておいた⑨発色基質液を 100 μ l/well 添加してください。
※細胞毒性の影響を確認するためには、1.の発色基質液添加前に波長 570nm 付近でウエル内菌液の濁度を測定しておいてください。
2. マイクロプレートを軽く振盪し、37°Cインキュベーター内で 1 時間発色させてください。
3. ⑨反応停止液を 100 μ l/well 添加し、反応を停止してください。室温で軽く振盪後、約 2~3 分で発色が安定するので、波長 620nm 付近 (610~670nm 間)で吸光度を計測してください。(吸収スペクトル参照)

[代謝活性化]

変異原性物質にはそのまま DNA に損傷を与えるものもあるが、体内で代謝酵素によって代謝されることで変異原性を示すものがあります。本キットではラットの肝臓をホモジネートして調製した S9 を添加することで体内で代謝されたのと同様の条件を作り、それにより代謝活性化されて変異原性を示すものを測定します。よって未知の被験物質に関しては S9 を添加しないもの(S9-)、S9 を添加したもの(S9+)の両方の条件で試験を行っていただく必要があります。これによって正確な評価が可能となります。

[検体の採取]

大気・河川水・食品・尿などから得た被験物質は一般的には低濃度で存在しますので、適当な抽出や濃縮が必要です。

[検体の希釈]

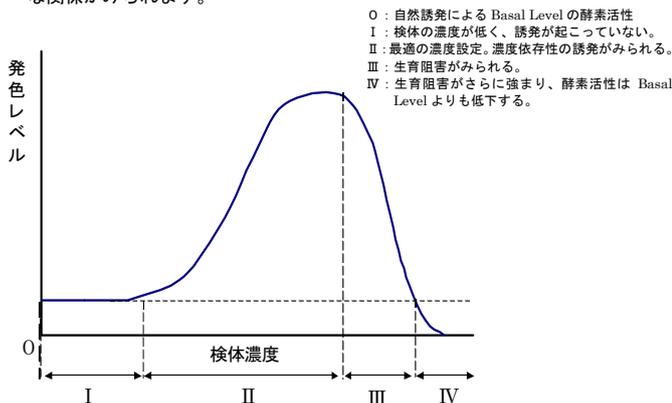
被験物質の希釈は、基本的には精製水で溶かしてください。非水溶性の場合はまず DMSO(ジメチルスルホキシド)に溶解し、白濁や溶解されなかった場合は本キットに使用可能である適当な溶媒を使用してください。

※DMSO、エタノール、メタノール以外の溶媒はポリスチレン製であるマイクロプレートに腐食などの影響をもたらす可能性があるため、先に菌液を分注した後にこれらの溶媒で溶かした検体を加えてください。

[未知検体の用量設定]

未知の検体の場合、広い濃度をカバーする必要があるため、溶媒に溶け得る最高濃度の溶液を作製し、これを段階的に希釈して予備試験を行ってください。予備試験から得られた結果から陽性の可能性となり得る領域を絞って再試験を実施していただくことでその未知検体の陽性となる濃度を判定してください。

検体濃度と誘発される発色レベル(吸光度)の関係は、一般に下図のような関係がみられます。



[結果判定]

陽性判定は溶媒対照(0 μ g/ml)で得られた吸光度の 2 倍以上を示した時の濃度を呈した場合、陽性とみなします。

[使用上の注意]

1. 使用説明書に記載した使用方法に従って使用してください。
記載された使用方法及び使用目的以外での使用については性能の保証範囲外といたします。
2. テスト菌株の取扱い
テスト菌株は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の遺伝子組換え生物等の第二種使用に該当します。取扱いについては拡散防止措置区分の P1 レベル以上で取扱い、施行規則、第二種省令等の法律を遵守してください。
詳細については「添付資料」を参照してください。なお菌を廃棄する際は適当な不活化処理を行ったうえで廃棄をしてください。
参考として、次亜塩素酸ナトリウム 0.1%(菌液 10ml に対して)試薬/次亜塩素酸ナトリウム液 0.2ml)、エタノール(最終濃度 30%以上)、あるいは使用後直ちに 121°C15 分間、高圧蒸気滅菌を行って不活化してください。
3. 陽性対照物質の取扱い
本キットには変異原性陽性対照(AF-2、2-AA)が添付されております。取扱う際には手袋や必要に応じて保護眼鏡等の安全対策を講じて取扱ってください。また廃棄する際には本製品が変異原性物質であることを明記し、産業廃棄物として業者に依頼して適切な処理によって廃棄してください。
4. 光の影響
本菌株は紫外線感受性ですので、直射日光に触れないよう操作を行ってください。
5. 構成試薬には有機溶媒(ジメチルスルホキシド:DMSO)を含むものがありますので、直接皮膚に触れないよう注意してください。万一皮膚や眼に入った場合、直ちに多量の水で十分に洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。

[保存方法]

- 80°C以下で保存し、使用期限内に使用してください。

[包装単位]

1 キット 9 6 ウエル (1 回使い切り)

[参考文献]

- 1) Yoshimitsu Oda, Sei-ichi Nakamura, Iwashiro Oki, Takeshi Kato and Hideo Shinagawa: Evaluation of the New System(*umu*-test) for the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens, Mutation Research, 147:219-229(1985)
- 2) G. Reifferscheid, J. Heil, Y. Oda, R.K.Zahn: A microplate version of SOS/*umu*-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples, Mutation Research, 253:215-222(1991)
- 3) Georg Reifferscheid, Jürgen Heil: Validation of the SOS/*umu*-test using test results of 486 chemicals and comparison with the *Ames* test and carcinogenicity data, Mutation Research, 369: 129-145(1996)
- 4) 小田美光: 第 1 章 変異原性試験法 *B.umu* テスト p30-43
続 医薬品の開発(第 11 巻) 医薬品の変異原性・遺伝毒性 廣川書店
- 5) 尾花裕孝、吉田善彦、中村清一: *umu* テストによる食品中の抗変異原因子の検索、大阪府立公衆衛生研究所報、17: 53-59
- 6) Yoshimitsu Oda, Hiroshi Yamazaki, Masahiko Watanabe, Takehiko Nohmi, Tsutomu Shimada: Highly sensitive *umu* test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM3009 Having high *O*-acetyltransferase and nitroreductase activities, Environment and Molecular Mutagenesis, 21: 357-364(1993)
- 7) Yoshimitsu Oda, Hiroshi Yamazaki, Masahiko Watanabe, Takehiko Nohmi, Tsutomu Shimada, Development of high sensitive *umu* test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high *O*-acetyltransferase activity, Mutation Research, 334: 145-156(1995)
- 8) 齊藤俊光、湯本総一、中嶋克行、小田美光: 変異原性試験試薬キット ウムラック AT(*umu* 試験法)の基礎的検討: 医療と検査機器・試薬、27(2): 105-113(2004)

[問い合わせ]

株式会社 蛋白精製工業
〒379-2203 群馬県伊勢崎市曲町 152-1
TEL: 0270-20-8571
FAX: 0270-20-8572
ホームページ: <http://www.pro-purify.co.jp>

製造販売元

 蛋白精製工業